

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-075879

(43)Date of publication of application : 23.03.1999

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07K 19/00
C12N 1/21
C12N 9/90
// (C12N 1/21
C12R 1:08)
(C12N 9/90
C12R 1:08)

(21)Application number : 10-190234

(71)Applicant : TOYOTA CENTRAL RES & DEV LAB
INC

(22)Date of filing : 06.07.1998

(72)Inventor : KAJINO TSUTOMU
TAKAHASHI HARUO
ASAMI OSAMU
YAMADA YUKIO
UDAKA JUZO

(30)Priority

Priority number : 09182523 Priority date : 08.07.1997 Priority country : JP

(54) DNA CODING FOR FUSION PROTEIN CONTAINING PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject DNA capable of accumulating a stabilized soluble foreign protein in a large amount in a culture medium by joining a DNA coding for the foreign protein to a DNA coding for a protein disulfide isomerase(PDI).

SOLUTION: A DNA coding for a foreign protein is joined to a DNA coding for a PDI such as the one derived from *Humicola insolens*. A secretory expression host cell is then transformed with an expression vector containing the resultant recombinant DNA or integrated into a genome and cultured to afford a fusion protein having a favorable steric structure.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-75879

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 19/00		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
9/90		9/90	
// (C 1 2 N 1/21			

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-190234	(71) 出願人	000003609 株式会社豊田中央研究所 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番 地の1
(22) 出願日	平成10年(1998) 7月6日	(72) 発明者	梶野 勉 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番 地の1 株式会社豊田中央研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平9-182523	(72) 発明者	高橋 治雄 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番 地の1 株式会社豊田中央研究所内
(32) 優先日	平9(1997) 7月8日	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインジスルフィドイソメラーゼを含有する融合タンパク質をコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 宿主から分泌され正しく再生されたタンパク質を効率よく製造するための手段の提供。

【解決手段】 選択された異種タンパク質とプロテインジスルフィドイソメラーゼ (P D I) との融合タンパク質をコードするDNA、該DNAを含んで成るベクター、該ベクターにより形質転換された宿主、及び該宿主を用いての前記融合タンパク質又は選択されたタンパク質の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 選択された異種タンパク質とプロテインジスルフィドイソメラーゼとの融合タンパク質をコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、選択された異種タンパク質とプロテインジスルフィドイソメラーゼとの融合タンパク質をコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子組換え技術の発展により、多くのタンパク質は細菌、真菌、ほ乳類をはじめとする多様な発現系により遺伝子工学的に発現されるようになってきた。しかしながら、異種タンパク質の発現に関して細菌を宿主細胞として使用すると、多くの場合問題が発生する。

【0003】例えば、大腸菌をはじめとする菌体内生産系を用いた場合、生産された異種タンパク質は菌体内に蓄積され、多くの場合細胞封入体を形成する。封入体を形成した異種タンパク質は、その存在状態故に生物学的あるいは生化学的に不活性であるため、活性型のタンパク質を得るためには、可溶化、再生の操作がさらに必要となる。すなわち、可溶化、再生の操作が成功しない場合、活性型のタンパク質はほとんど得られない。しかしながら可溶化、再生の条件、操作は未だ確立されておらず、技術的に困難な場合が多い。

【0004】これらの問題を解決するため、異種タンパク質を望ましいタンパク質との融合タンパク質として発現することが行われる。融合する望ましいタンパク質としてlacZ、麦芽糖結合タンパク質、及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等が含まれる〔「カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」2巻、補遺10、ジョンウィリーアンドサンズ出版、ニューヨーク及びスミス等「ジーン」67:31-40(1988)〕。

【0005】また、日本国特許2513978号では、チオレドキシンの融合体を開示している。しかしながら、これらのタンパク質との融合は別の問題を呈することが多い。たとえばタンパク質の翻訳効率が発現レベルを大きく左右することが知られている。この翻訳効率は、開始コドンを含む領域のDNA配列に依存するが、この現象を支配する明確なメカニズムは明らかではない。

【0006】このため目的異種タンパク質のN末端での融合は、発現レベルに予想不可能な影響を及ぼすことが多い。さらに、菌体内に生産、蓄積された異種タンパク質は、菌体からの抽出およびその抽出液からの精製に多大の時間と労力を要するだけでなく、目的とするタンパク質を完全な形で純粋に得ることが容易ではない。この点において、当業界で現在使用されている融合相手タン

パク質の一部は融合タンパク質の精製を容易にするための固有の特性を有していない。

【0007】一方、バチルス属に属する微生物は、古くから種々の菌体外酵素の生産菌として工業的に利用されている。これらの菌体外酵素のうち、バチルス・アミロリクイファシエンズの α -アミラーゼ遺伝子〔I. Palva et. al, Gene, 22, 229 (1983)〕、バチルス・リケニフォルミスのペニシリナーゼ遺伝子や枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子等が既にクローン化され、これらのプロモーターおよびシグナルペプチドを利用した異種タンパク質の菌体外分泌生産系が報告されている。この菌体外分泌生産系では、上記の菌体内生産系で問題となる封入体形成はほとんど認められず、可溶化状態での異種タンパク質の生産を可能にすると共に、菌体からの抽出操作が不要なため、生産コストを削減できる。

【0008】しかしながら、分泌生産系により異種タンパク質を生産する場合、他の不具合を呈することもある。例えば、異種タンパク質の高レベル分泌生産を達成させるポイントの一つがタンパク質の分泌効率であることが知られている。タンパク質の分泌効率は、シグナルペプチドの配列やこれに続く成熟タンパク質のアミノ酸配列（特にN末端領域のアミノ酸配列）、さらには宿主細胞の備える分泌装置等の相互の關係に支配されていると考えられるが、これらの詳細については明らかではない。このため、異種タンパク質の分泌発現では、生産レベルが著しく低い場合があるが、この不具合の予測は非常に困難である。

【0009】さらに、目的異種タンパク質が相当レベル菌体外に分泌生産された場合でも、さらに別の問題が生じる。タンパク質は、立体配座の自由度が高いため、膨大な数の可能な構造をとりうる。しかし、活性タンパク質の立体配座は、多くの可能な構造の内の一部のものであって、望ましいアミノ酸配列を有する異種タンパク質が分泌されても、活性が低い場合もありうる。

【0010】生体内におけるタンパク質の高次構造形成のメカニズムに関しては、近年、多くの研究がなされ、好ましい構造形成を助ける分子シャペロンやジスルフィド結合をつなぎ換えるプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)が、タンパク質の好ましい構造形成に大きな役割を演じていると考えられている。例えば、バチルス・プレビス菌には菌体外にジスルフィド交換酵素が存在しており、分泌タンパク質の高次構造形成に寄与していると考えられる。しかしながら異種タンパク質を高レベルで発現すると、宿主細胞の有するシャペロン等の機能が量的に不足することも考えられる。このことは、異種タンパク質生産系においてタンパク質の高次構造的な不具合の原因になりうる。

【0011】また更に、宿主細胞の有するほとんどのタンパク質は菌体内に存在するため、異種タンパク質を菌体外に分泌生産させる場合、目的異種タンパク質の精製

10

20

30

40

50

のプロセスは大幅に合理化されるが、多くの場合、目的異種タンパク質は精製プロセスをさらに容易にする固有の特性を有していない。それ故、分泌発現系に於いても、生産された異種タンパク質の精製は依然として大きな問題であることが多い。従って、組換え発現系の技術分野では、研究、診断、治療および工業材料適用における使用を目的とする活性型のタンパク質の製造および精製に関する新規組成物および方法が依然として要望されている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】異種タンパク質の分泌発現系においては、分泌障害、立体構造的な不具合等の問題で、現在報告されているいずれの分泌生産系も満足できるものとはいえない。

【0013】

【課題を解決するための手段】発明者らは、組換え発現系において安定的に異種タンパク質を培地中に発現できる組換え分泌発現系の開発を行ってきた。この際、高温カビの一種であるフミコラ・インソレンス由来のPDIが分泌発現系において高効率で分泌発現されることを見出した（特開平7-107980）。一方、分泌効率が低い異種タンパク質を効率的に分泌発現できる組換え発現系を作出すべく研究を重ねたところ、目的異種タンパク質に特定の様態でPDIを連結して融合タンパク質として発現させることにより、目的異種タンパク質を効率的に分泌生産できることを見出した。

【0014】したがって、前記課題は異種タンパク質をコードするDNAにPDIをコードするDNAを連結した組換えDNAの使用により解決される。すなわち、本発明によれば、通常限られた量のタンパク質が培地中に蓄積されるある種の宿主細胞において、望ましい立体構造を有する異種タンパク質を培地中に多量に蓄積させることを可能にする融合タンパク質をコードするDNA構成、およびそれらを保持する宿主細胞、およびかかる宿主細胞を栄養培地に培養することを特徴とする融合タンパク質の製造方法、さらには、かかる融合タンパク質から目的異種タンパク質を切断することを特徴とする目的異種タンパク質の製造方法が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】この発明によると、通常限られた量のタンパク質が培地中に蓄積されるある種の宿主細胞において、安定した可溶性の異種タンパク質を培地中に多量に製造することができる。また、この発明の融合タンパク質は、目的異種タンパク質においてその望ましい立体構造を達成させ得る。

【0016】本発明においては異種タンパク質をコードするDNA配列は、例えばフミコラ・インソレンス由来のPDIをコードするDNA配列に融合された形態で宿主細胞において発現される。PDIは真核生物に広く存在し、生体内では小胞体内腔に分布する分泌タンパク質

であり、その量は小胞体内タンパク質の10%以上を占める。この高分泌特性は組換え分泌発現系において、融合タンパク質の高分泌能の一因となりうる。

【0017】さらにフミコラ・インソレンス由来のPDIはヒト、牛等の他起源のPDIに比べ高い熱安定性を有しており、80℃においても最適温度の50%もの活性が残存している。本発明のPDIの耐熱性は、その構造が著しく堅く、安定であることに起因するものと考えられる。この構造的特性は目的異種タンパク質との融合タンパク質において、融合による構造的な影響を最小限にしようとするとともに、PDIと異種タンパク質がそれぞれ固有の構造を有するのに大きく役立つ。さらに上記構造的な理由から融合タンパク質において融合された個々のタンパク質はそれぞれ固有の機能を有しうる。

【0018】上記の理由により、本発明においてはフミコラ・インソレンス由来のPDIが好ましく、このPDIのアミノ酸配列及びそれをコードするDNAの塩基配列並びにそのクローニング方法は、例えば特開平6-253857に詳細に記載されている。組換え発現系において、PDIのリフォールディング活性は好ましくないジスルフィド結合の形成を防止し、また、シャペロン活性と相まって異種タンパク質の望ましい構造形成を促すことにより、目的異種タンパク質が不活性化する不具合を解決するのに役立つ。

【0019】選択したタンパク質およびPDIのDNA配列を含む本発明の融合配列の構築は、当業界における一般的な遺伝子工学技術を使用する〔サンプブック等、「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1988）参照〕。融合配列は、幾つかの異なる方法により構築されうる。例えば、選択した異種タンパク質は、PDI分子のアミノ末端に融合されうる。また別法として、選択した異種タンパク質は、PDIのカルボキシル末端に融合されうる。

【0020】選択された異種タンパク質に、PDIを融合するにあたっては、その融合様式に因らず、融合はいずれのタンパク質の天然構造をも不安定にすることなく行われる。高効率分泌生産に適したPDIへの融合により、目的異種タンパク質の分泌効率は改善される他、PDIのジスルフィド交換活性や、シャペロン活性等は目的異種タンパク質の望ましい構造形成を促進し、目的異種タンパク質が不活性化する不具合を解決するのに役立つ。さらに、異種タンパク質に連結されたPDIのジスルフィド交換活性や、シャペロン活性等は目的異種タンパク質の望ましい構造の維持にも効果があり得る。このことは、PDIとの融合により目的異種タンパク質の安定性を向上させうることを意味する。

【0021】この発明によるPDIおよび目的異種タンパク質の融合配列は、所望によりPDIと目的異種タン

10

20

30

40

50

バク質との間に挿入されたリンカーペプチドを含みうる。このリンカー配列には、慣用的に用いられる化学的または酵素的により選択的に開裂または消化可能なポリペプチドをコードしていてもよい。例えば酵素的開裂部位には、タンパク質分解酵素、例えばエンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラゲナーゼおよびトロンビンによる開裂部位がある。別法として、リンカーにおけるかい裂部位は、選択した化学物質、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミンまたは酸性条件下に暴露したときに開裂され得る部位でありうる。さらにリンカー配列は、インテインのように自己消化により開裂する配列を有していてもよい。

【0022】酵素的開裂をもたらす具体的なアミノ酸配列としては、例えば、エンテロキナーゼについてはAsp-Asp-Asp-Lys/Lys、第Xa因子についてはIle-Glu-Gly-Arg/、トリプシンについてはArg/X、コラゲナーゼについてはX/Gly、そしてトロンビンについてはLeu-Val-Pro-Arg/Gly（いずれも/で示した部分が開裂される）である。また、化学的に開裂（破壊）されるアミノ酸としては、臭化シアンについてはMet/X、ヒドロキシルアミンについてはAsn/Glyが挙げられる。

【0023】PDI融合タンパク質は、選択した開裂部位での開裂により、異種タンパク質が分離され、成熟型の異種タンパク質が得られる。次いで成熟異種タンパク質は、当業界における一般的な手法により、PDIフラグメントを含まない精製された形態で得られる。開裂部位は、当業界において一般的に知られている望ましい開裂部位であればいずれのものでもよく、また開裂部位が、この発明のリンカー部位に挿入されることは、この発明を制限するものではない。

【0024】本発明の融合配列に挿入されるリンカー配列は、上記開裂部位の提供以外の目的にも役立つ。例えば、融合配列に挿入されるリンカーは、PDI分子および選択した異種タンパク質分子間の立体障害を阻止するのに十分な長さのアミノ酸配列であっても良い。前記のリンカー配列が必要かどうかは、選択した異種タンパク質の構造的特徴および生成した融合タンパク質が開裂せずとも有用であるかどうかにより異なる。例えば、選択された異種タンパク質が工業的用途に用いられる酵素である場合、融合タンパク質はそれ自体目的の用途に対して有用であり得る。また、融合タンパク質が自然開裂し、目的異種タンパク質が成熟型で得られる場合、リンカーは全く必要ない。

【0025】従って、この発明の一つの様態として、融合配列は、そのアミノまたはカルボキシル末端が、選択したタンパク質の配列へ直接融合したPDI配列を含む。この発明は特定の異種タンパク質に限定されるわけではなく、多様な異種遺伝子が本発明の融合配列の形成

には有用である。この発明の組成物および方法は組換え分泌生産系において非常に少量しか発現されないタンパク質に特に有用であって、異種タンパク質はいずれかの発現系において治療、診断、研究または工業材料に適用されるあらゆるタンパク質を含みうる。

【0026】例えば、抗体、ホルモン、サイトカイン、成長因子、阻害因子、酵素等の生理活性タンパク質、あるいはこれらを修飾したタンパク質はこの発明により細菌、酵母、は乳類または他の真核細胞のそれに適した発現系により生産されうる。この発明を説明している実施例には、本発明の対象タンパク質として抗体およびゲラニルゲラニル・ピロフォスフェイト・シンターゼ（EC 2. 5. 1. 29）が例示されている。これらのタンパク質をPDIとの融合なしに酵母あるいはバチルス・ブレビス等の細菌を宿主とする分泌生産系で発現すると、発現量が著しく少ないか、発現されても不活性化してしまう。

【0027】上記のようなPDIと目的異種タンパク質とを連結した融合タンパク質をコードするDNA分子は、この発明による異種タンパク質発現のための他の配列を伴いうる。すなわち、この発明による望ましいDNA配列は、所望の宿主細胞における融合タンパク質の発現を指示しうる発現制御配列を随伴し、その制御下にある上記融合配列を含む。例えば宿主細胞がバチルス・ブレビス株である場合、DNA分子はバチルス・ブレビスで機能するプロモーター、リボソーム結合部位を含み、また融合タンパク質の分泌を指示する分泌シグナル配列を有する。また所望により、選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよく、さらにDNA分子が宿主細胞内において染色体外に存在する場合、複製開始点を含んでも良い。

【0028】バチルス・ブレビス株で機能する具体的な前記配列は鶴高ら（Method in Enzymology 217, 73-33）により公知である。細菌発現に関してそれに使用される発現ベクターも鶴高（Method in Enzymology 217, 23-33）により公知にされているほか、当業界では前記の成分を含む多くの細菌発現ベクターが知られており、標準的な分子生物学技術により容易に構築されうる。

【0029】同様に宿主細胞が酵母や乳類をはじめとする他の真核細胞の場合、公知な酵母や乳類をはじめとする他の真核細胞のベクターおよびベクター成分が使用できる。融合配列を含むDNA分子は、当業界で通常行われるとおり選択した宿主細胞での発現を最適化するようにコドンの選択が修飾されうる。これらのDNA分子において融合配列は多コピー存在しても良い。また、同様にPDI配列あるいは目的異種タンパク配列が各々多コピー存在しても良い。

【0030】本発明に適した宿主細胞は、好ましくは細菌細胞である。当業界において分泌発現宿主細胞としてよく知られているバチルス・ブレビス47株あるいはH

PD31株は鶴高ら (Method in Enzymology 217, 23-33) により公知である他、下記実施例で使用されるバチルス・プレビス31-OK株は梶野ら (特開平6-296485) により工業技術院生命工学技術研究所にFERM P-13274として寄託されている。またバチルス・サチルスをはじめとする他のバチルス属やシュードモナス属等の様々な株もこの発明において使用される。また、酵母細胞も本発明に望ましい宿主細胞である。サッカロマイセス・セレビシアエの様々な株は当該分野において宿主細胞として常用されている。同様に、当該分野において知られている他の真核生物細胞や公知のは乳類細胞も本発明の宿主細胞として使用される。

【0031】この発明の融合タンパク質を製造するため、宿主細胞は好ましくは発現制御配列を有する融合タンパク質をコードするDNA分子により形質転換されるか、またはそれがゲノムへ組み込まれている。上記の宿主細胞は製造に適した公知の条件下で培養される。生長培地中に分泌された融合タンパク質は選択的沈殿、カラムクロマトグラフィー法を含む慣用的方法により精製される。また、発明者により公知の抗PDI抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィー等の精製手法は、PDI融合タンパク質の精製において他の慣用的手法に比べ特に有用であり得る。

【0032】この発明の組成物及び方法の具体的な態様では、フミコラ・インソレンスのPDI遺伝子は発明者らによりクローニングされている。発現プラスミドpNU211L4PDIはバチルス・プレビスで機能するプロモーター等の発現制御下に分泌シグナルに続くPDI遺伝子を有する。このプラスミドはバチルスプレビス宿主31-OK株において、高効率(約1g/l)でPDIを生長培地中に分泌しうる。実施例では、このプラスミドを用いて抗体及び菌体内酵素であるGGPSとのPDI融合タンパク質を形成及び発現させる方法を記載している。この発明の方法及び組成物により研究、診断、治療、工業材料分野に有用なタンパク質の製造が可能になる。

【0033】この発明の融合タンパク質の製造は幾つかの利点を有する。本発明によれば、従来分泌発現が困難であった多くの異種タンパク質を容易に菌体外に分泌生産させ得る。また、生成した融合タンパク質は可溶性であり、多くの場合好ましい立体構造を形成しうる。更に、選択された異種タンパク質の安定性はPDIとの融合化により向上しうる。

【0034】

【実施例】次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. PDI-抗体 (Fab) 融合分子

PDI様配列としてカビ由来のPDIおよび選択した異種タンパク質として11-デオキシコルチゾール (11-deoxycortisol) に対するモノクローナル抗体由来のV_κ

C_κおよびV_H C_H 部位をコードする遺伝子を用いて融合タンパク質分泌発現系を構築した。11-デオキシコルチゾールに対するモノクローナル抗体のDNAは黒沢らの「モレキュラー・イミュノロジー28:1063-1072 (1991)」記載のハイブリドーマから得た。

【0035】すでにクローン化している「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・バイオケミストリー58:1424-1429 (1994)」に記載のフミコラ・インソレンス由来のPDIを用いて、マニアスらの「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル」、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ニューヨーク (1989)」により記載された標準組換えDNA技術を用いることにより分泌用発現プラスミドを構築した。

【0036】PDI-V_κC_κおよびV_H C_H 融合タンパク質をコードする遺伝子の構築はPDIのN末端からチオレドキシンと相同性のある活性中心と考えられる配列の1つを含んだ70アミノ酸、及び相同性のある配列の2つを含んだ300アミノ酸及びPDI全体にリンカー部位とエンテロキナーゼでの切断部位を有する配列 (例えばGSGSGDDDDK) を介し抗体のV_κC_κ およびV_H C_H 部位さらにはV_κC_κ のカルボキシ末端にプロテインAを連結させたタンパク質の全アミノ酸配列を有するDNAをコードする遺伝子上記記載のマニアスらの方法により構築した (図1参照)。また発現ベクターはバチルス・プレビス用に開発されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含んだpNU212を用い、NcoI-HindIII の部位に融合タンパク質遺伝子を導入して分泌発現が可能となるように設計した。

【0037】融合タンパク質の発現

形質転換は、鶴高らの「アグリカルチュラル・バイオロジカルケミストリー53:3099-311 (1989)」に記載の方法によりエレクトロポレーション法により行った。バチルス・プレビスの宿主株としては特願平5-32090に記載の31-OK株を用いて形質転換した。

【0038】形質転換用培地は1%W/Vポリペプトン、0.5%カツオエキス、0.2%イーストエキストラクト及び1%グルコース (pH7) で構成されるT2培地に10mg/l FeSO₄ · 7H₂O、10mg/l MnSO₄ · 4H₂O、1mg/l ZnSO₄ · 7H₂O及び10μg/mlエリスロマイシンを添加した1.5%W/V寒天プレートにおいて形質転換体を選択した。

【0039】得られた形質転換体をYC培地 [3%W/VポリペプトンP1、0.2%W/Vイーストエキストラクト、3%W/Vグルコース、0.1g/l塩化カルシウム2水塩、0.1g/l硫酸マグネシウム7水塩、10mg/l硫酸鉄・7水塩、10mg/l硫酸マンガン・4

水塩、1mq/1硫酸亜鉛7水塩；pH7.2）で30℃、6日間培養した。培養上清10μlを用いてその中のタンパク質を還元下でジャガーらの「アナリティカル・バイオケミストリー」166:368-379（1987）の方法に従い12% SDS-PAGEにより分離し、ウエスタンブロットの手法を用いてニトロセルロース膜上に固定した。家禽に免疫して得たマウスF（a b）2抗体を一次抗体として用いた。ブロットしたニトロセルロースフィルターを第一抗体と反応させた後、第2抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ラビットIgG抗体を用いて、バイオラッド社アルカリフォスファターゼ発色キット）で発色させ、発現している融合タンパク質化した抗体分子を検出した。

【0040】PDIのN末端から70アミノ酸、300アミノ酸及び融合タンパク質化したものに関してはFab抗体と反応を示すタンパク質を発現するクローンは得られたが、発現量は低く6日の培養によっても5mq/l以下であった。この量はPDIとの融合タンパク質としない場合の発現量と同等以下であった。また、大腸菌のチオレドキシンと融合タンパク質化したものでも発現量は5mq/l以下であった。

【0041】一方、native PDIにVκCκまたはV_HC_Hを結合し融合タンパク質化したものでは50mq/l以上の発現ができるようになった。このことは、チオレドキシン等との相同性の有る活性中心を含む配列*

表 1

	再構築の割合
単独での再構築	35%
融合タンパク質からの再構築	65%

【0045】抗体分子の活性の確認

活性の確認はエンザイム・イムノアッセイにより行った。11デオキシコルチゾールをカルボキシメトキシアミン塩酸塩を反応させた後、卵白アルブミンに反応させたものをエンザイム・イムノアッセイ用の抗原とした。この抗原をリン酸緩衝化生理食塩水に溶解したのちヌンク社の96穴プレートに入れて4℃一晩反応して固定した。プレートをリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄したのち、大日本製薬社のブロックエースで室温で3時間反応させて非特異的な反応を抑制した。プレートをリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄したのち、リン酸緩衝化生理食塩水に0.1%のチャップスを加えた溶液に溶かしたハイブリドーマから得た抗体もしくは再構築した抗体を加え室温で1時間反応させた。

【0046】プレートをリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄したのち、家禽に免疫して得た抗マウスF（a b）2抗体を0.1%ツイーン20を含むリン酸緩衝化生理食塩水に溶解した溶液で室温で1時間反応した。さらにプレ

*の部位のみをリーダー配列として用いる場合には、分泌生産系においては生産量に対する寄与は少なく、PDI分子全体を用いた場合にのみ大幅な生産性の向上が可能であることを示している。

【0042】抗体分子の再構築

融合タンパク質を含む1ml培養液を5mM EDTA存在下、20単位の牛エンテロキナーゼ「レプリクスラ、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー」254:1677-1683（1979）により開裂した。開裂したPDIを含むVκCκおよびV_HC_Hを37℃で3時間の再構築反応を行った。

【0043】再構築の確認は非還元下でジャガーらの「アナリティカル・バイオケミストリー」166:368-379（1987）の方法に従い12% SDS-PAGEで解析した。その結果、融合タンパク質から開裂したVκCκとV_HC_Hを再構築した方がVκCκとV_HC_Hを単独で再構築したものに比べてFab型になっているものの割合が上昇していることが明らかになった。また培地からカラム法などにより融合タンパク質を精製してからトリス-塩酸緩衝液などで再構築した場合も同様の結果であり、さらに再構築している抗体分子の割合が上昇していた。

【0044】

【表1】

ートをリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄したのち、家禽に免疫して得た抗ウサギIgG抗体をアルカリフォスファターゼで標識したものをを用いて室温で1時間反応させた。プレートをリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄したのち、バイオラッド社アルカリフォスファターゼ発色キットで発色させた。その結果、本発明の方法で得た抗体はハイブリドーマから得られた抗体と同等の反応性を示すことが確認された（図2）。

【0047】実施例2. VκCκをPDIとの融合タンパク質にすることによる分泌の促進

マウスモノクローナル抗体のVκCκを単独あるいはPDIとの融合タンパク質として発現するバチルス・プレビスをYC培地で30℃、6日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清と菌体をそれぞれ得た。菌体は、生理食塩水に懸濁した後再度遠心する洗浄操作を3回繰り返し、培養液と等量のリン酸緩衝液（50mMリン酸ナトリウム、pH7.0）に懸濁した後、超音波処理（150W30秒x6）により菌体を破砕した。破砕液から遠心

分離により残差を除き、この菌体抽出液を菌体画分とした。上記で得られた培養上清と菌体画分に存在するV κ C κ を前記の方法と同様に抗マウスモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットにより検出した。

【0048】抗体のV κ C κ を単独で発現させた場合、培養上清中にはわずかの目的タンパク質しか検出されない(図、レーン2)のに対し、菌体画分にはシグナル配列が切断されていない前駆体が多量に検出されており

(図、レーン1)、抗体V κ C κ の分泌生産においては目的タンパク質の分泌過程が障害となり生産量が低くとどまっていることが判った。一方、PDIとの融合タンパク質として発現させた場合は、培養上清に融合タンパク質が多量に検出されたが(図、レーン4)、菌体画分にはほとんど抗体V κ C κ は検出されず(図、レーン3)、融合タンパク質は障害なく分泌されていることが分かった。このことは、本来分泌されにくい抗体V κ C κ がPDIとの融合化により効率的に分泌できることを示しており、PDIとの融合化によりタンパク質の分泌生産性が向上する一つのメカニズムが明らかになった。

【0049】実施例3. PDI-GGPS (Geranylgeranyl pyrophosphate synthase ; グラニルグラニル2リン酸合成酵素)

高度好熱性古細菌由来のグラニルグラニル2リン酸合成酵素は実施例1に示されたpNU212関連の発現ベクターを用いることによってPDI融合タンパク質としてパチルスプレビスにおいて高レベルで発現された。グラニルグラニル2リン酸合成酵素を発現させるために大沼*

表 2

	50 (°C)	60	70	80 (温度)
GGPS	100 (%)	85	50	25 (残存活性)
PDI-GGPS	100	100	95	80 (")

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例1において抗体を発現させた場合に用いた遺伝子の構成を示す図である。

【図2】図2は、本発明に従って、PDIとの融合タンパク質を経由して製造された抗体とハイブリドーマから※

*らにより示される「ジャーナルオブバイオロジカル・ケミストリー」269:14792-14797(1994)に記載の完全長のGGPSをコードするDNA配列に抗体遺伝子の部位を変換した。この酵素の発現に使用される宿主および発現プロトコルは実施例1に記載の方法に従った。

【0050】本酵素においても、チオレドキシン及びPDIのN末端から70および300アミノ酸とGGPSの融合タンパク質を形成した場合においてはやはり発現量は上昇せず5mg/l以下であった。しかしながらPDI全体との融合タンパク質とした場合には発現量は大幅に上昇し100mg/l以上の発現量を示した。また本酵素の活性および基質特異性を「小倉ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」269:20561-20566(1984)記載の方法により測定したところ、完全長PDIとの融合タンパク質の場合においてはもとのGGPSと完全に一致した。このことはPDIが融合タンパク質の状態でもタンパク質の折り畳みを制御していることを示している。

【0051】安定性の確認

GGPSとPDIとの融合タンパク質をpH7の緩衝液中で30日間インキュベーションを行い残存活性の測定を行った。GGPSは70℃で約50%低下したのに対してPDIとの融合タンパク質は80℃でも20%程度の低下であった。

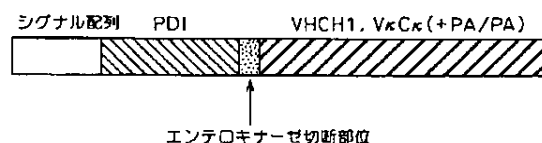
【表2】

※得られた対象抗体との抗原結合性を比較したグラフである。

【図3】図3は、V κ C κ を単独で発現させた場合と、PDIとの融合タンパク質として発現させた場合との、分泌効率の比較を示すグラフである。

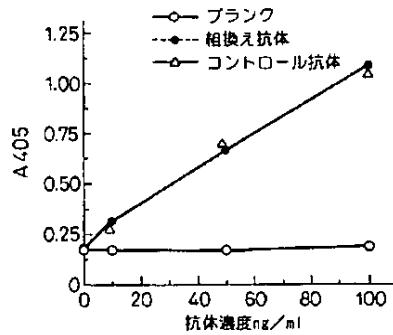
【図1】

図 1



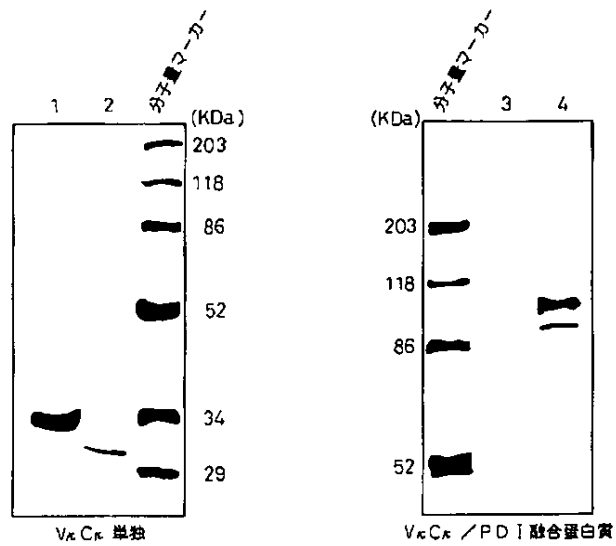
【図2】

図 2



【図3】

図 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:08)

(C 1 2 N 9/90

C 1 2 R 1:08)

(72)発明者 浅見 修

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番

地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 山田 幸生

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番

地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 鵜▲高▼ 重三

愛知県名古屋市名東区植園町1丁目24-3